

WOLFGANG STAPF

**ÜBER DEN MECHANISMUS DER PROTEOLYSE
DURCH TRYPSIN**

UNTERSUCHUNGEN MIT HILFE VON 6-AMINODITHIO-
CAPRONSÄUREÄTHYLESTER-p-TOLUOLSULFONAT

FRANKFURT AM MAIN 1971



Gedruckt mit Genehmigung
der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

Dekan : Prof. Dr. H. Oelschläger

1. Gutachter : Prof. Dr. H. Hartmann

2. Gutachter : Prof. Dr. H. Kessler

Tag der mündlichen Prüfung : 14.7.1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545303_0025

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. H. Hartmann, danke ich herzlich für sein großes Interesse und die Unterstützung, die er der vorliegenden Arbeit entgegenbrachte.

Herrn Dr. J. Heidberg sei für Anregung und Diskussion gedankt.

Frau Dr. W. Ilse danke ich für die freundliche Förderung meiner Arbeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich wegen gewährter materieller Hilfe zu Dank verpflichtet.

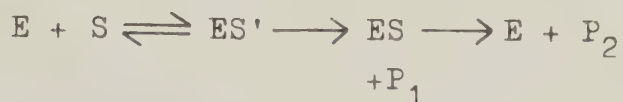
Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Problemstellung	4
B. Experimentelles	6
1) Substanzen	6
a) Herstellung von 6-Aminodithiocapron- säureäthylester-p-toluolsulfonat	6
b) 2N-Benzoyl-L-lysinäthylester-p- toluolsulfonat	7
c) Trypsin	7
2) Meßmethoden	8
a) pH-Stat-Messungen	8
b) UV-Messungen	9
C. Ergebnisse	11
1) Untersuchung der spontanen Hydrolyse von 6-Aminodithiocapronsäureäthylester-p- toluolsulfonat	11
2) Bestimmung der Michaelis-Menten- Konstanten von 6-Aminodithiocapron- säureäthylester-p-toluolsulfonat	15
3) Inhibitionsmessungen am System 6-Amino- dithiocapronsäureäthylester-p-toluol- sulfonat/2N-Benzoyl-L-lysinäthylester- p-toluolsulfonat	17
4) Untersuchung der Endprodukte der tryptischen Hydrolyse von 6-Amino- dithiocapronsäureäthylester-p-toluol- sulfonat im UV-Spektrometer	19

D. Diskussion	23
1) Spontane Hydrolyse	23
2) Tryptische Hydrolyse	24
E. Zusammenfassung	30
Literaturverzeichnis	31

A. Problemstellung

Die Wirkungsweise proteolytischer Enzyme wird im allgemeinen durch folgenden Mechanismus beschrieben:



Hierbei bedeuten ES' den Michaelis-Menten-Komplex, ES das als Zwischenprodukt gebildete Acyl-Enzym und P_1 , P_2 die Produkte der Hydrolyse. Der Untersuchung dieses intermediären Acyl-Enzyms am Beispiel des Enzyms Trypsin soll die vorliegende Arbeit dienen.

Lowe und Williams ¹⁾ konnten bei den Enzymen Papain und Ficin durch Verwendung eines Thionoesters als Substrat die Bildung eines intermediären Acyl-Enzyms spektroskopisch nachweisen. Verantwortlich für die Bildung des Acyl-Enzyms bei Trypsin ist die OH-Gruppe eines Serinmoleküls. Benutzt man einen Dithioester als Substrat, so sollte das entstehende Acyl-Enzym ein Thionoester sein. Die Absorption von Thionoester ist bekannt ²⁾, und damit sollte der spektroskopische Nachweis des Acyl-Enzyms möglich sein. Wir wählten als Substrat das bisher unbekannte, von uns hergestellte 6-Aminodithiocaprinsäureäthylester-p-toluolsulfonat (TCET) ³⁾, dessen Sauerstoffanalogon ein recht gutes Substrat für Trypsin darstellt [Michaelis-Menten-Konstante K_m und Geschwindigkeitskonstante der Produktbildung k_o für 6-Aminocaprinsäureäthylesterhydrochlorid bei 25,0 °C, pH 6,60 und μ 0,1 M KCl; in Klammern zum Vergleich die Werte für das spezifische Substrat 2N-Benzoyl-L-lysinäthylester-p-toluolsulfonat: $K_m = 20 \pm 3 \times 10^{-5}$ M ($4,4 \pm 0,2 \times 10^{-5}$ M) $k_o = 4,4 \pm 0,4 \text{ min}^{-1}$ ($3,95 \pm 0,15 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$)] ^{4,5)}. Da TCET, im Gegensatz zu seinem Sauerstoffanalogon, bei

dem pH-Wert der tryptischen Hydrolyse (6,60) spontan hydrolysiert, wurden auch die Konstanten der spontanen Hydrolyse ermittelt.

Der Mechanismus der spontanen Hydrolyse von Dithioestern und insbesondere von TCET ist unbekannt. Er wurde von uns nur insoweit untersucht, als zur Klärung des Mechanismus der tryptischen Spaltung nötig war. Inhibitionsmessungen sollten zeigen, ob TCET die tryptische Hydrolyse spezifischer Substrate kompetitiv inhibiert und damit Aussagen über den Bindungsort des Substrats liefern. Die Untersuchung der Endprodukte der tryptischen Hydrolyse in einem UV-Spektrometer sollte Aufschlüsse über den Mechanismus der Spaltung von TCET durch Trypsin geben.

dem pH-Wert der tryptischen Hydrolyse (6,60) spontan hydrolysiert, wurden auch die Konstanten der spontanen Hydrolyse ermittelt.

Der Mechanismus der spontanen Hydrolyse von Dithioestern und insbesondere von TCET ist unbekannt. Er wurde von uns nur insoweit untersucht, als zur Klärung des Mechanismus der tryptischen Spaltung nötig war. Inhibitionsmessungen sollten zeigen, ob TCET die tryptische Hydrolyse spezifischer Substrate kompetitiv inhibiert und damit Aussagen über den Bindungsort des Substrats liefern. Die Untersuchung der Endprodukte der tryptischen Hydrolyse in einem UV-Spektrometer sollte Aufschlüsse über den Mechanismus der Spaltung von TCET durch Trypsin geben.

B. Experimentelles

1) Substanzen

a) Herstellung von 6-Aminodithiocaprone- säure-äthylester-p-toluolsulfonat (TCET)³⁾

6-Aminocapronitril: 10 g Adipinsäuredinitril in 120 ml n-Butanol wurden katalytisch mit 10 g Raney-Nickel bei 75-80 °C und ca. 720 Torr drei Stunden hydriert. Anschließend wurde über Kieselgur filtriert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand enthielt neben 6-Aminocapronitril noch Hexamethyldiamin und unumgesetztes Adipinsäuredinitril. Nach fraktionierter Destillation im Vakuum wurde 6-Aminocapronitril (Siedepunkt₁₅ 130 °C) in Äther aufgenommen und als p-Toluolsulfonat gefällt. Ausbeute: 4,6 g 15 % d.Th.
Schmelzpunkt: 135 °C

TCET: 2,3 g 6-Aminocapronitril-p-toluolsulfonat wurden bei Raumtemperatur mit 25 ml Dichlormethan, 4 ml Äthylmercaptan und 6 ml 18 prozentiger ätherischer Chlorwasserstoff-Lösung versetzt. Nach 24 Stunden wurde eingedampft und der Rückstand in H₂S-gesättigtem Pyridin gelöst. In diese Lösung wurde bei Eiskühlung 1,5 Stunden Schwefelwasserstoff eingeleitet, anschließend im Vakuum eingedampft und der Rückstand aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute: 1,42 g 48,2 % d.Th.
Schmelzpunkt: 123 °C

Elementaranalyse: C₁₅ H₂₅ N O₃ S₃ M = 363,6

Ber.: C 49,60 % H 6,85 % N 3,86 % S 26,50 %

Gef.: 49,12 % 6,57 % 4,14 % 26,70 %

Optische Eigenschaften von TCET (bei 25 °C)

$\lambda_{\max}$ in H₂O = 3070 Å $\lambda_{\max}$ in Chloroform = 4450

log ε = 4,028 log ε = 1,364

b) 2N-Benzoyl-L-lysinäthylester-p-toluolsulfonat
(BLEET)⁴⁾

Das nach der Vorschrift von Bergmann⁶⁾ hergestellte 2N-Benzoyl-L-lysinäthylesterhydrochlorid wurde in wenig Wasser aufgenommen, mit 10 prozentiger Sodalösung versetzt und diese Lösung mit Chloroform und Äther extrahiert. Die vereinigte Chloroform-Äther-Mischung wurde mit 5 prozentiger Sodalösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen und der Rückstand mit in abs. Äthanol gelöster p-Toluolsulfonsäure neutralisiert. Das Produkt wurde aus Äthanol-Äther umkristallisiert.

Schmelzpunkt: 117 ° C

Optische Drehung der 0,98 %igen Lösung in Wasser:

$$\alpha_{578}^{21} = 15,7^{\circ} \text{ cm}^2/\text{g}$$

Elementaranalyse: C₂₂ H₃₀ O₆ N₂ S M = 450,56

Ber.: C 58,65 % H 6,71 % N 6,22 % S 7,12 %

Gef.: 58,21 % 6,97 % 6,14 % 7,36 %

c) Trypsin

Die Hydrolysen wurden mit einem Präparat, TR 15330, der Firma C.F.Boehringer und Söhne G.m.b.H. Mannheim durchgeführt. Das Präparat wurde durch Messung der Michaelis-Menten-Konstanten von BLEET charakterisiert. Es ergaben sich folgende Meßwerte (25,0° C, pH 6,60, 0,1 M KCl):

$$K_m = 4,70 \pm 0,3 \times 10^{-5} \text{ M} \quad k_o = 3,85 \pm 0,25 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$$

Zum Vergleich dienten folgende Daten⁴⁾:

$$K_m = 4,37 \pm 0,2 \times 10^{-5} \text{ M} \quad k_o = 3,95 \pm 0,15 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$$

2) Meßmethoden

a) pH-Stat-Messungen

Spontane und tryptische Hydrolysen von TCET, sowie die Inhibitionskonstante des Systems BLEET/TCET, wurden mit einer pH-Stat-Apparatur der Firma Radiometer/Kopenhagen gemessen.

Zur Messung der spontanen Hydrolyse wurden Lösungen bestimmter Konzentration an TCET in 0,1 M KCl hergestellt, ein bestimmtes Volumen dieser Lösung (4,5 - 5 ml) in eine mit Rührer und Elektroden ausgestattete Polyäthylenküvette gefüllt und ca. 5 Minuten thermostatisiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf den pH-Wert gebracht bei dem gemessen werden sollte. Die Apparatur hielt diesen pH-Wert durch Zugabe von 0,02 N Natronlauge konstant und zeichnete den Verbrauch der Natronlauge gegen die Zeit auf.

Aus diesem Zeit-Konzentration-Diagramm wurde die Geschwindigkeit der Hydrolyse durch Anlegen der Tangente ermittelt. Um den Effekt, der durch eventuelle Folgereaktionen auftreten könnte, möglichst klein zu halten, erschien es ratsam die Geschwindigkeit am Anfang der Reaktion zu messen. Hierbei mußte aber in Betracht gezogen werden, daß die Meßergebnisse durch Antitrier-effekte verfälscht werden können. Aus diesen Gründen entschieden wir uns, die Geschwindigkeit jeweils ca. 1 Minute nach dem Start der Hydrolyse zu ermitteln.

Für jede Konzentration wurden mehrere Messungen durchgeführt und die gemittelten Werte zur Auswertung verwendet.

Die Messung der tryptischen Hydrolyse folgte dem gleichen Schema. Die Zugabe der Trypsinlösung (0,1 ml) erfolgte durch eine mit einer Polyäthylenspitze versehene Pipette direkt in die auf pH 6,60 gebrachte Reaktionslösung.

Bei den Inhibitionsmessungen wurde ein Meßvolumen von 20 ml benutzt, wodurch die Schwankungen der Einzelmessungen stark zurückgingen. Die Konzentration an TCET wurde durch Einwaage bestimmt, die von BLEET aus dem Gesamtverbrauch an Natronlauge ermittelt. Im übrigen wurde wie vorher beschrieben verfahren.

Für alle mit Hilfe der pH-Stat-Methode ermittelten und im folgenden angegebenen Größen wurde der mittlere quadratische Fehler berechnet⁷⁾.

b) UV-Messungen

Die UV-Messungen wurden mit einem Beckman DK 2-Spektrometer durchgeführt.

Zur Ermittlung der Endprodukte der spontanen Hydrolyse von TCET wurden Lösungen bestimmter Konzentrationen an TCET in Puffern verschiedener pH-Werte hergestellt. Für pH-Werte bis pH 8 wurde Phosphat-Puffer, für höhere pH-Werte Borsäure/Kaliumchlorid-Natronlauge-Puffer der Firma Merck-Darmstadt benutzt.

Die Pufferlösungen (10 ml) wurden ca. 10 Minuten bei 25,0° C thermostatisiert und anschließend mit 1 ml einer wässrigen TCET-Lösung versetzt. Je nach pH-Wert der Lösung wurde nach 10 Minuten bis 15 Stunden eine Probe (1 ml) entnommen. Die Zeit wurde so gewählt, daß ca. 40 % des eingesetzten TCET hydrolysiert waren.

Die entnommene Probe wurde bei pH 6,60 mit Wasser, bei höheren pH-Werten mit Phosphat-Puffer pH 6,60 verdünnt und sofort ein UV-Spektrogramm der Lösung aufgenommen. Die Verdünnung der Proben mit höheren pH-Werten durch Puffer pH 6,60 gewährleistete, daß alle Proben bei gleichem pH-Wert gemessen wurden, und daß die Hydrolysegeschwindigkeit soweit erniedrigt wurde, daß im Zeitraum der Messung keine merkbare Hydrolyse stattfand.

Zur Untersuchung der tryptischen Hydrolyse wurden 3 Lösungen gleicher Konzentration an TCET mit Phosphat-Puffer pH 6,60 wie oben beschrieben hergestellt.

Die erste Lösung wurde mit 0,4 ml H_2O , die zweite mit 0,2 ml H_2O und 0,2 ml Trypsinlösung, die dritte mit 0,4 ml Trypsinlösung versetzt, so daß Lösungen gleicher TCET-Konzentration mit 0 mg, x mg und 2x mg Trypsin entstanden.

Die Lösungen wurden 15 Stunden bei $25,0^{\circ} C$ thermostatisiert, anschließend Proben entnommen und wie bei der spontanen Hydrolyse weiterverarbeitet.

C. Ergebnisse

1) Untersuchung der spontanen Hydrolyse von 6-Aminodithiocaprinsäureäthylester-p-toluol- sulfonat

Die spontane Hydrolyse von TCET verläuft nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden mit Hilfe pH-Stat-Apparatur für 4 Temperaturen bei pH 6,65 graphisch ermittelt (Abb. 1).

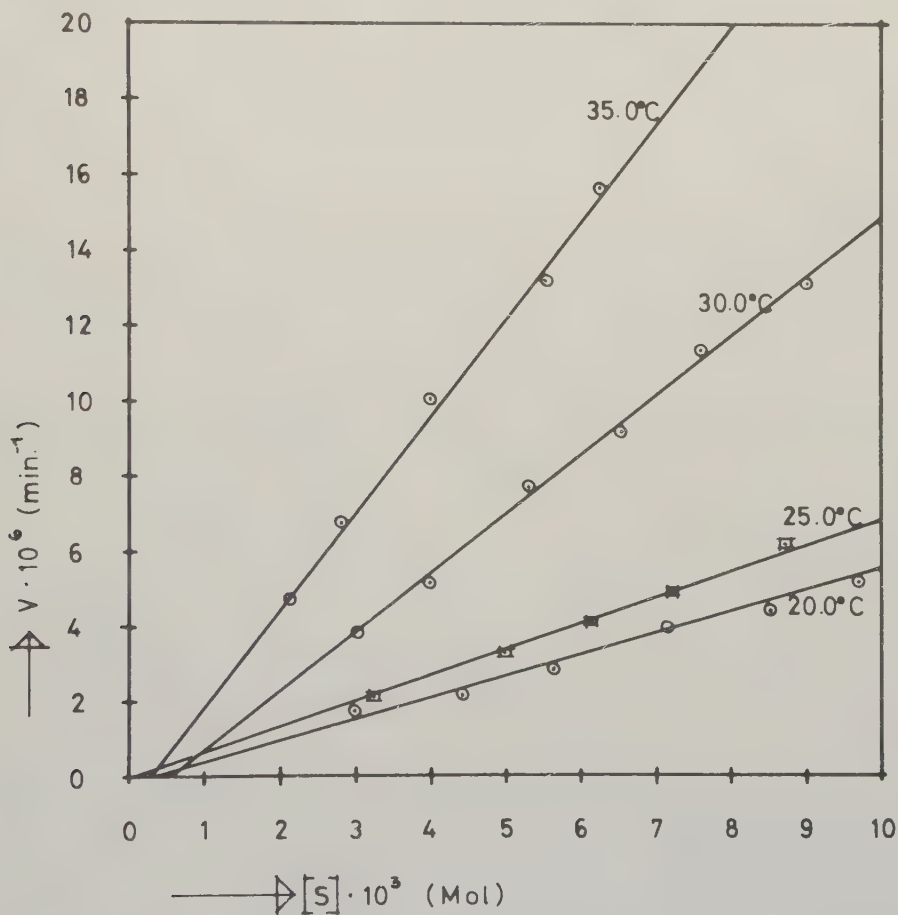


Abb. 1

$$k_{20} = 6,0 \pm 0,2 \times 10^{-4} \text{ (min}^{-1}\text{)}$$

$$k_{25} = 8,4 \pm 0,2 \times 10^{-4} \text{ (min}^{-1}\text{)}$$

$$k_{30} = 17,5 \pm 0,3 \times 10^{-4} \text{ (min}^{-1}\text{)}$$

$$k_{35} = 26,0 \pm 0,3 \times 10^{-4} \text{ (min}^{-1}\text{)}$$

Aus den Geschwindigkeitskonstanten wurden die Arrhenius-Parameter graphisch bestimmt (Abb. 2).

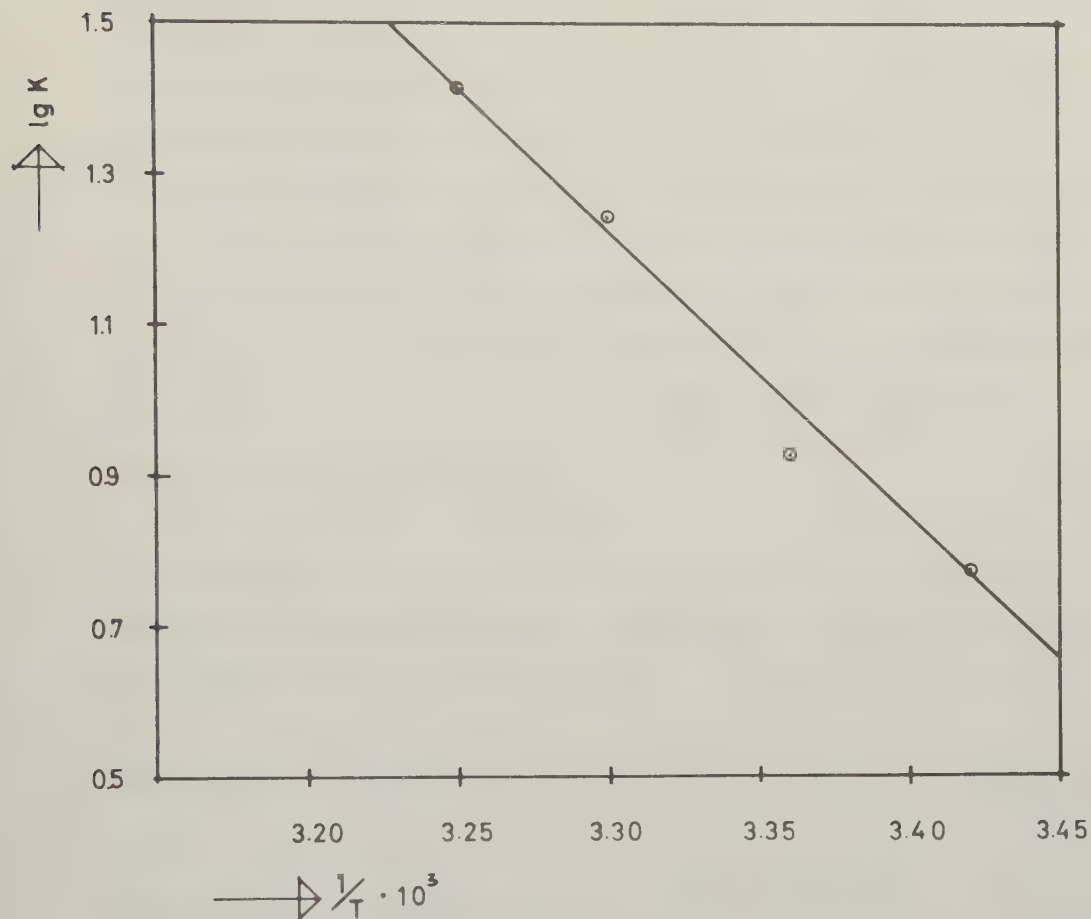


Abb. 2

Aktivierungsenergie $E_A = 17,0 \pm 1,2$ Kcal

Häufigkeitsfaktor $\log k_0 = 10,41 \pm 1,25$ (k_0 in min^{-1})

Eine Untersuchung der Endprodukte der spontanen Hydrolyse (pH 6,65; 25,0 °C) von TCET zeigte, daß diese nicht einheitlich verläuft. Es konnten zwei Endprodukte spektroskopisch nachgewiesen werden, deren Absorptionsmaxima bei 3300 Å bzw. 2670 Å liegen.

Wurde die Hydrolyse bei höherem pH-Wert (ab pH 8) durchgeführt, so war nur noch ein Produkt (Absorption 2670 Å) spektroskopisch nachweisbar. Nach Lage des Absorptionsmaximums konnte es sich hierbei um

Thiocaprolactam handeln, denn sek. Thioamide absorbieren bei $2680 \text{ Å}^{2)}$. Wir stellten deshalb Thiocaprolactam⁸⁾ her und verglichen diese Substanz mit dem Hydrolyseprodukt. Das Absorptionsmaximum von Thiocaprolactam liegt bei 2670 Å , der molare Extinktionskoeffizient ϵ beträgt 14600. Außer der Übereinstimmung des Absorptionsmaximums verglichen wir Hydrolyseprodukt und Thiocaprolactam mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Beide Substanzen zeigten in Petroläther/Essigester (2:1) den gleichen RF-Wert (0,39). Auf Grund dieser Untersuchung ordneten wir die Absorptionsbande bei 2670 Å Thiocaprolactam zu.

Wir verglichen nun spektroskopisch das gebildete Thiocaprolactam mit dem umgesetzten Dithioester bei verschiedenen pH-Werten.

T ° C	pH	-TCET	+Thiolactam	%Thiolactam
25,0	6,60	$4,24 \times 10^{-5} \text{ M}$	$2,12 \times 10^{-5} \text{ M}$	50 %
25,0	7,00	$3,82 \times 10^{-5} \text{ M}$	$2,48 \times 10^{-5} \text{ M}$	65 %
25,0	8,00	$5,76 \times 10^{-5} \text{ M}$	$4,43 \times 10^{-5} \text{ M}$	77 %
25,0	9,00	$4,65 \times 10^{-5} \text{ M}$	$4,19 \times 10^{-5} \text{ M}$	90 %

Wurde die Hydrolyse in 0,01 N Natronlauge durchgeführt, so wurde TCET vollständig in Thiocaprolactam überführt.

Die Absorptionsbande bei 3300 Å war schlecht zu erkennen, da sie auf der Flanke der Dithioesterabsorption lag. Da aber TCET, wie vorher beschrieben, in stark alkalischer Lösung vollständig in Thiocaprolactam übergeht, konnten wir diese Absorptionsbande durch Zugabe von 1N Natronlauge (Konzentration der Lösung an Natronlauge $1 \times 10^{-2} \text{ M}$) deutlich sichtbar machen.

Diese Bande wurde durch ihre Lage und ihr Verhalten⁹⁾, in saurem Medium verschiebt sie sich zum kurzwelligeren Bereich, als Absorption der 6-Aminodithiocaprönsäure identifiziert. Die Absorption bei 3300 Å entspricht dem Dithiocarbönsäureanion, die Absorption in saurem Medium (3070 Å) der undissoziierten Dithiocarbönsäure.

Ein Vergleich der Hydrolyseprodukte mit der umgesetzten Menge an Dithioester ergab, wenn nicht ausschließlich Thiocaprolactam entstand, einen Fehlbetrag auf Seiten der Hydrolyseprodukte.

Dieser Fehlbetrag kann damit erklärt werden, daß 6-Aminodithiocaprönsäure bei den Bedingungen der Hydrolyse nicht beständig ist, was durch die zeitliche Abnahme der Dithiosäure-Absorptionsbande bestätigt wird.

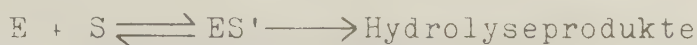
Andere, von uns hergestellte Dithioamino-säureester³⁾ (N-Benzoylglycinäthylester, N-Acetyldithiophenylalanin-äthylester) ergeben bei der Hydrolyse ausschließlich Dithioamino-säuren. Die Beständigkeit dieser Dithioamino-säuren bestätigt die bei 6-Aminodithiocaprönsäure gemachten Erfahrungen.

Die Hydrolysegeschwindigkeit dieser Ester ist ebenso wie bei TCET deutlich abhängig von der Konzentration der OH-Ionen.

Die Hydrolyse von Dithioamino-säureestern verläuft also nach einem $B_{Al}2$ -Mechanismus, was im Einklang mit der Säurestärke der Dithiocarbönsäuren steht^{9, 10)}. Bei TCET tritt eine zweite Reaktion mit der S-Alkyl-Spaltung in Konkurrenz, nämlich die Bildung von Thiocaprolactam. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion nimmt mit steigender OH-Ionenkonzentration stärker zu als die der S-Alkyl-Spaltung, so daß in stark alkalischer Lösung ausschließlich Thiocaprolactam gebildet wird.

2) Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten von
6-Aminodithiocapronsäureäthylester-p-toluol-
sulfonat

Die durch Trypsin katalysierte Hydrolyse von TCET



wurde durch das Zeitgesetz für die enzymatische
Hydrolyse in der linearisierten Form nach Eadie¹¹⁾

$$\frac{v}{E_0} = k_0 + K_m \frac{v}{E_0 S}$$

beschrieben.

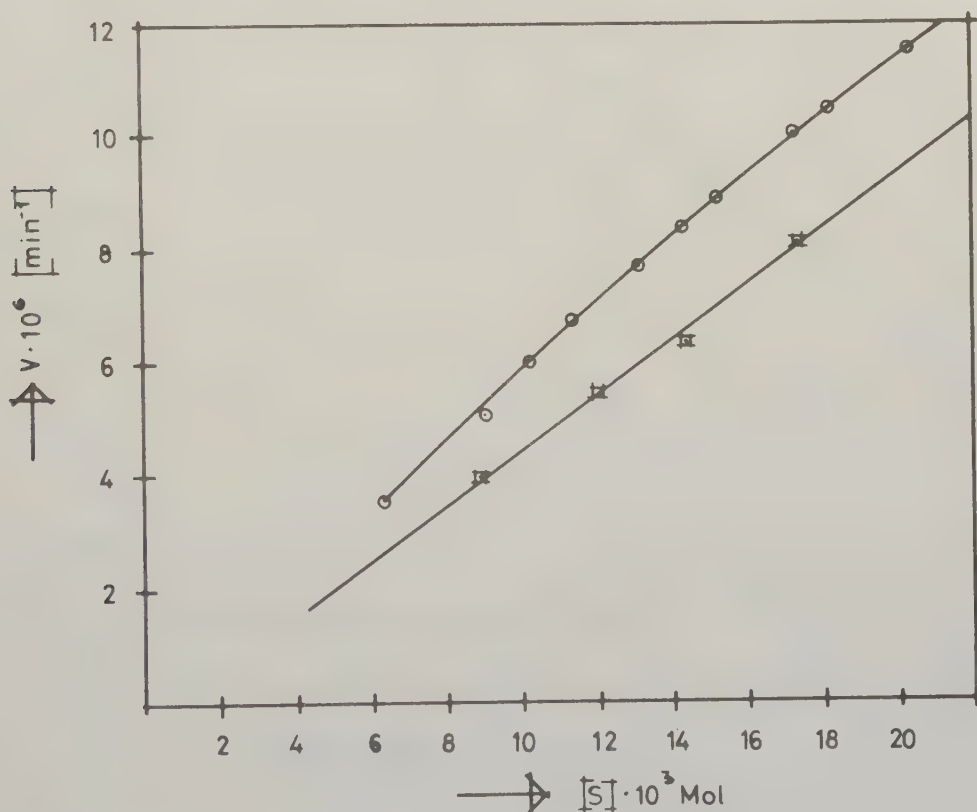


Abb. 3

Spontane Hydrolyse von TCET

o Gesamthydrolyse von TCET

Zur Ermittlung der Geschwindigkeiten der tryptischen
Hydrolyse mußten tryptische und spontane Hydrolyse
separiert werden. Hierzu wurden die Geschwindigkeits-

Zeit-Diagramme für die Gesamthydrolyse und die spontane Hydrolyse im gleichen Konzentrationsbereich erstellt, und die Geschwindigkeit der tryptischen Hydrolyse durch graphische Subtraktion ermittelt (Abb. 3).

Mit den so gefundenen Geschwindigkeiten wurden die charakteristischen Konstanten der enzymatischen Katalyse K_m und k_o für die tryptische Hydrolyse von TCET ermittelt (Abb. 4).

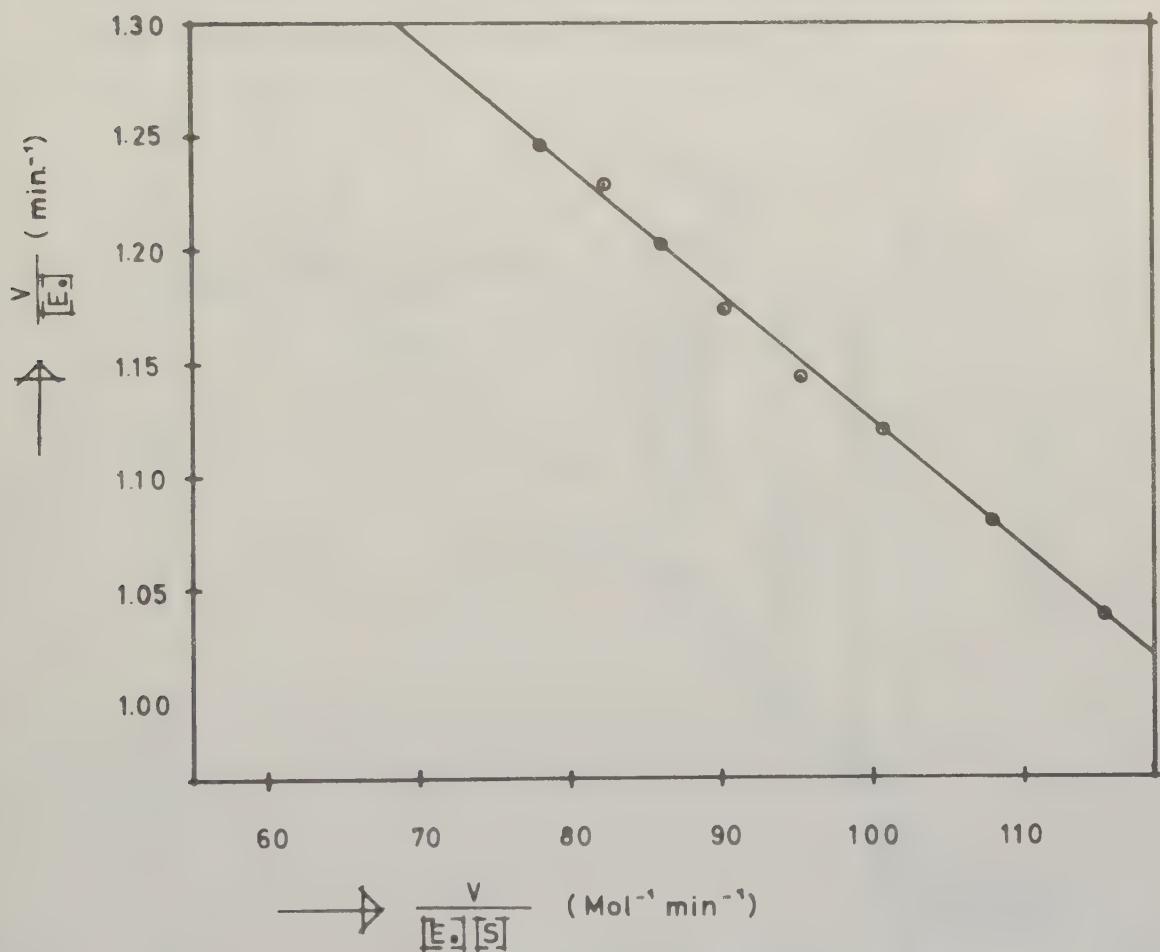


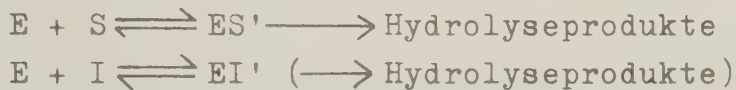
Abb. 4

Eadie-Linearisierung der tryptischen Hydrolyse von TCET (pH 6,60; 25,0 °C; μ 0,1 M KCl)

$$K_m = 5,1 \pm 0,4 \times 10^{-3} \text{ M} \quad k_o = 1,65 \pm 0,35 \text{ min}^{-1}$$

3) Inhibitionsmessungen am System 6-Aminodithio-
capronsäureäthylester-p-toluolsulfonat/2N-Benzoyl-
L-Lysinäthylester-p-toluolsulfonat

Bei der Untersuchung der Inhibitionswirkung von TCET
auf ein spezifisches Substrat (BLEET) wurde die Eigen-
hydrolyse von TCET vernachlässigt.



Die Berechtigung dieser Vernachlässigung ergab sich
aus der Form der pH-Stat-Diagramme (Abb. 5).

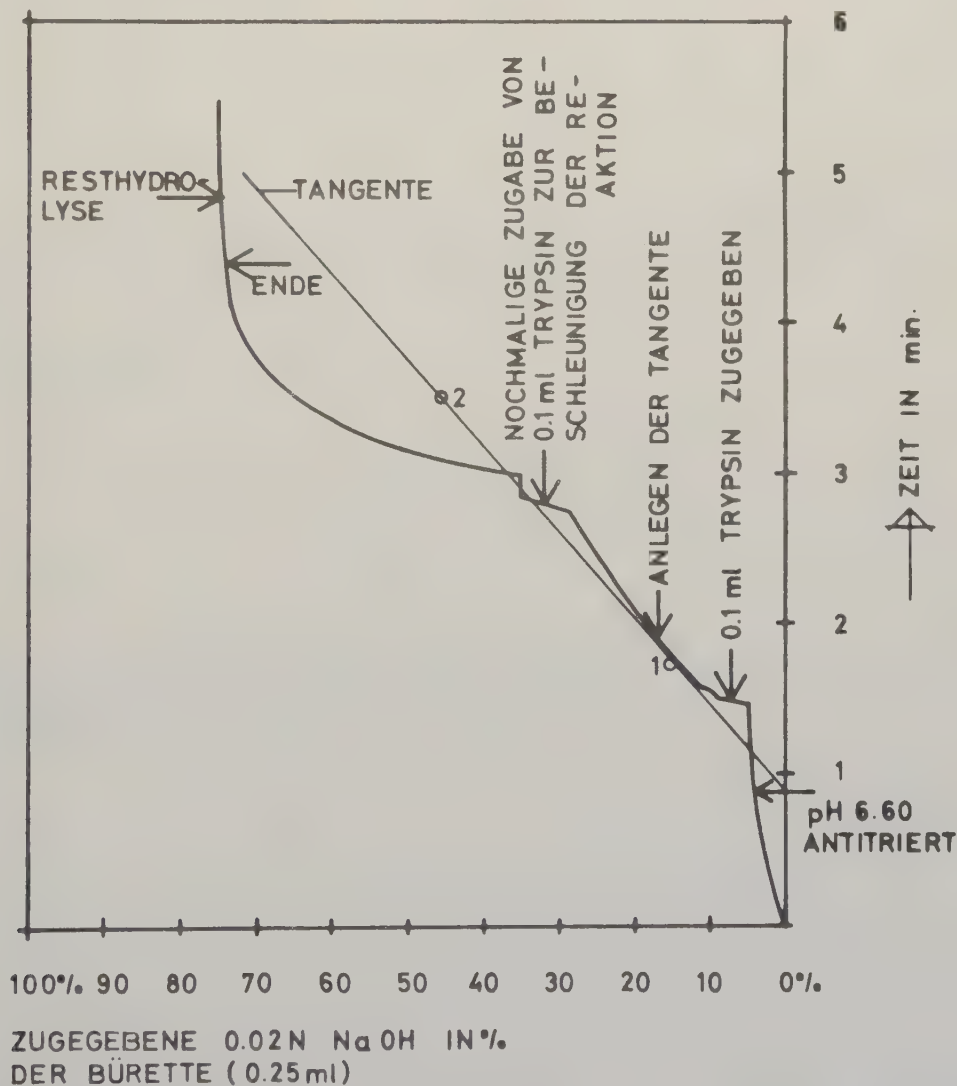


Abb. 5

pH-Stat-Kurve der durch TCET inhibierten
tryptischen Hydrolyse von BLEET

Da die Inhibitorkonzentration ungefähr das Zwanzigfache der Substratkonzentration beträgt, entspricht die nach der Spaltung des spezifischen Substrats auftretende Resthydrolyse der Eigenhydrolyse von TCET. Ihre Geschwindigkeit beträgt weniger als 1 % der Geschwindigkeit der Substratspaltung und kann ohne weiteres vernachlässigt werden.

Die Inhibition der tryptischen Hydrolyse von BLEET durch TCET wird durch das Zeitgesetz für die kompetitive Inhibition ¹²⁾ in der linearisierten Form nach Eadie ¹¹⁾

$$\frac{v}{E_0} = k_0 - K_m \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \frac{v}{E_0 S}$$

beschrieben, wenn die Substratkonzentration, bei gleichbleibender Inhibitorkonzentration, variiert wird.

Daraus ergibt sich für K_i

$$K_i = \frac{I}{\frac{K'_m}{K_m} - 1}$$

wobei K'_m die Konstante der gehemmten und K_m die Konstante der ungehemmten Hydrolyse ist.

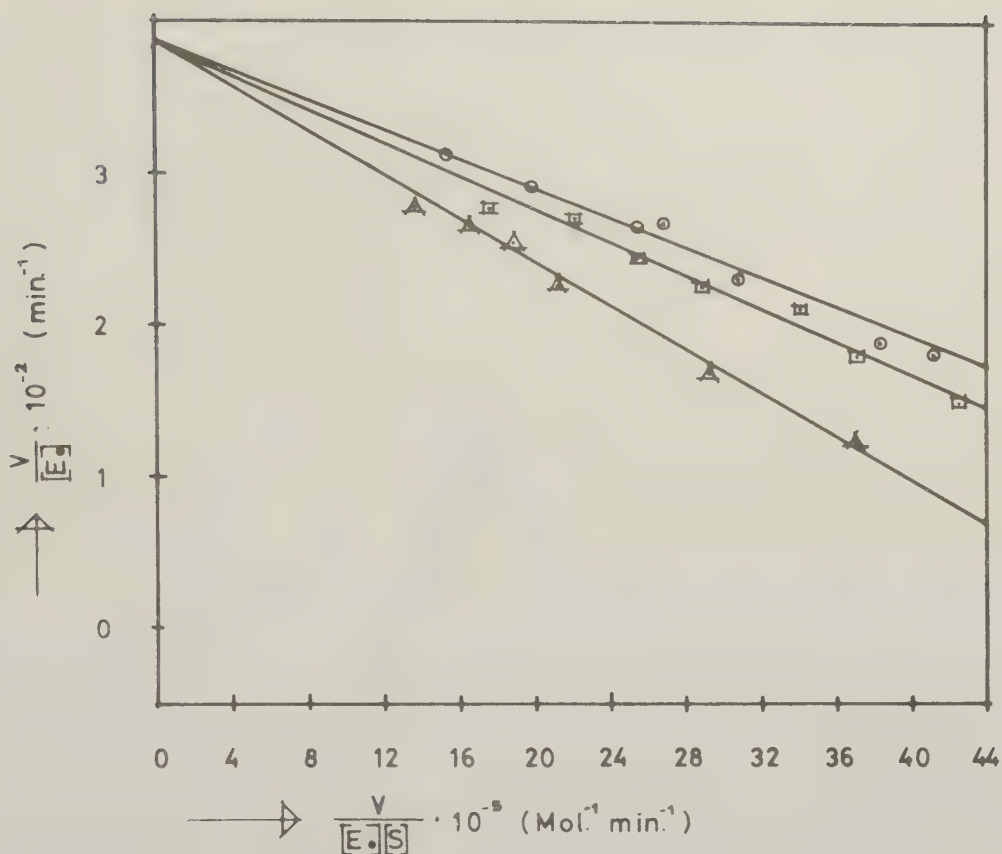


Abb. 6

Eadie-Linearisierung der ungehemmten ○ und der durch TCET inhibierten (□ I = $0,58 \times 10^{-3} \text{ M}$ △ I = $1,32 \times 10^{-3} \text{ M}$) tryptischen Hydrolyse von BLEET (pH = 6,60, T = 25,0 °C).

Für die Inhibitionskonstante von TCET bei 25,0 °C und pH 6,60 ergab sich folgender Wert:

$$K_i = 4,96 \pm 0,4 \times 10^{-3} \text{ M}$$

4) Untersuchung der Endprodukte der tryptischen Hydrolyse von 6-Aminodithiocaprinsäureäthylester-p-toluolsulfonat im UV-Spektrometer

Die spektroskopische Untersuchung der Endprodukte der tryptischen Hydrolyse von TCET zeigte, daß die gleichen Endprodukte wie bei der spontanen Hydrolyse auftreten.

Der Unterschied zwischen spontaner und tryptischer Hydrolyse lag in der unterschiedlichen Konzentration von 6-Aminodithiocapronsäure. Bei der tryptischen Hydrolyse entstand mehr 6-Aminodithiocapronsäure als bei der spontanen Hydrolyse (Abb. 7, 8).

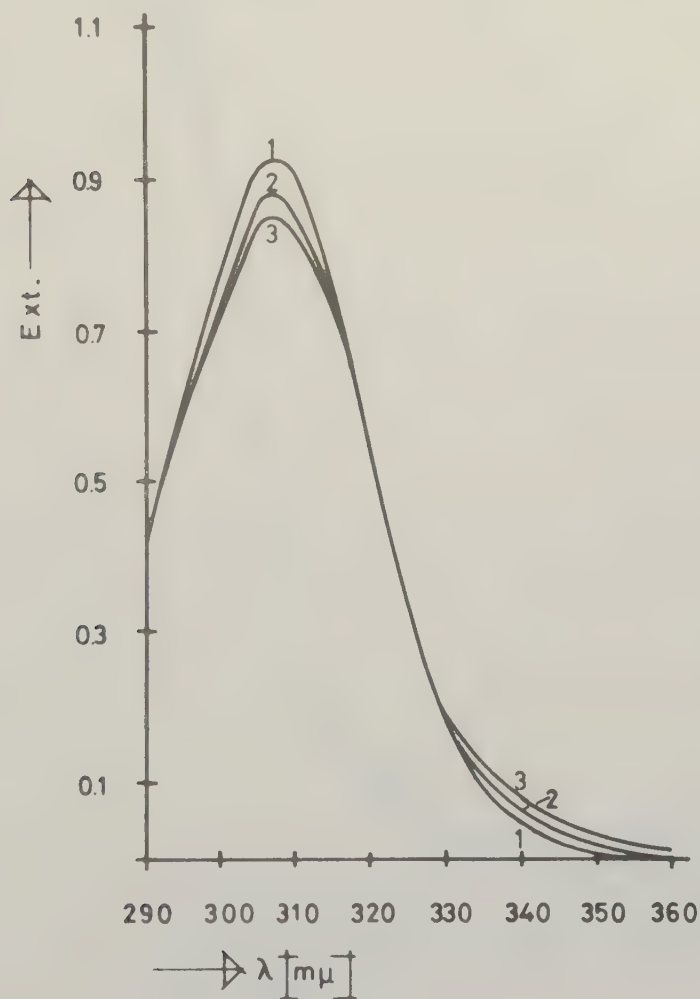


Abb. 7

UV-Spektrogramm von 3 Lösungen gleicher Konzentration an TCET und unterschiedlicher Trypsinkonzentration nach 15-stündiger Hydrolyse (pH 6,60; 25,0 °C)

- 1 Trypsinkonzentration 0
- 2 Trypsinkonzentration $3,41 \times 10^{-6}$ M
- 3 Trypsinkonzentration $6,82 \times 10^{-6}$ M

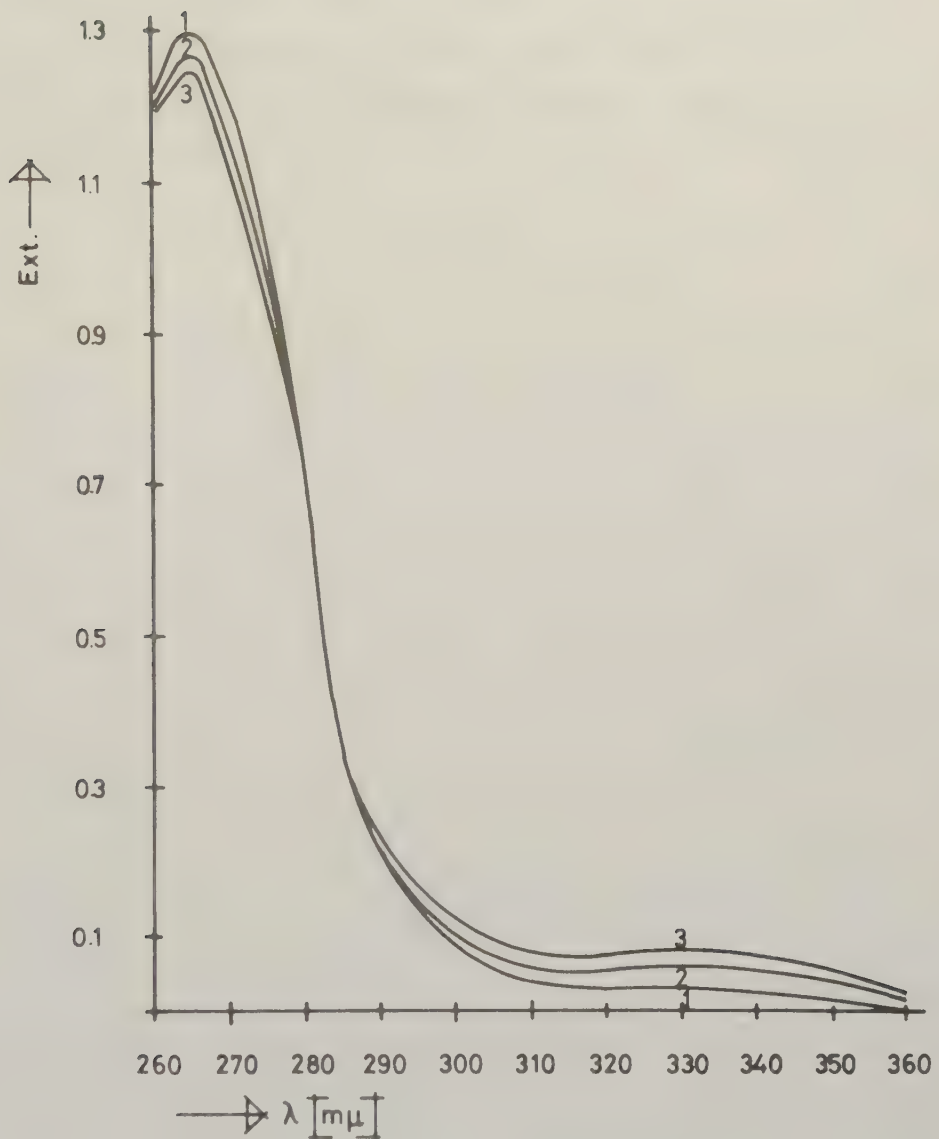


Abb. 8

UV-Spektrogramm der gleichen Proben wie in Abb. 7. Die Meßlösung wurde mit 1N NaOH auf eine Konzentration von 0,01 M an NaOH gebracht und 4 Minuten nach der Zugabe der NaOH gemessen.

Die Mehrausbeute an 6-Aminodithiocaprone Säure war der Enzymkonzentration proportional und entsprach in etwa dem Mehrumsatz an TCET. Eine genaue Übereinstimmung konnte nicht erwartet werden, da, wie bei der Untersuchung der spontanen Hydrolyse festgestellt wurde, 6-Aminodithiocaprone Säure bei den Bedingungen der Hydrolyse nicht beständig ist.

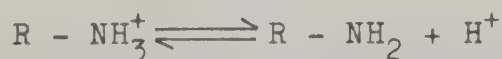
D. Diskussion

1) Spontane Hydrolyse

Obwohl die Synthese von Dithiocarbonsäuren schon lange bekannt ist¹³, waren keine Daten über ihre Hydrolyse zu finden. Lediglich Y. Sakurada berichtet, daß er bei der Hydrolyse von verschiedenen Dithiocarbonsäureäthylestern mit KOH die entsprechenden Dithiocarbonsäuren erhielt. Dieser Befund stimmt mit den von uns bei Dithioamino-säurederivaten gemachten Erfahrungen überein. Wir stellten bei der Hydrolyse der Dithioamino-säure-ester (zwischen pH 6,6 und 10,0) eine starke pH-Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit fest. Es handelt sich demnach um eine Esterhydrolyse nach dem B_{AL}² - Mechanismus.

Soweit mir bekannt ist, ist dies der bisher einzige Fall, abgesehen von den Spaltungen einiger Lactone^{14,15}, für einen B_{AL}² - Mechanismus bei der Spaltung von Carbonsäureestern.

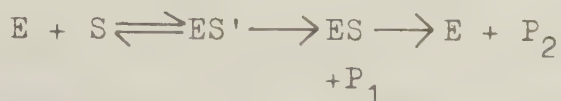
Daß bei Dithiocarbonsäuren auch ein nucleophiler Angriff auf den Acyl-Kohlenstoff möglich ist, zeigt die Reaktion von 6-Aminodithiocaprinsäure-äthylester-p-toluolsulfonat zu Thionocaprolactam. Die starke pH-Abhängigkeit dieser Reaktion ist wohl auf die Verschiebung des



Gleichgewichts der Aminogruppe zurückzuführen, da nur die freie Aminogruppe reagiert.

2) Tryptische Hydrolyse

Der Mechanismus der durch Trypsin katalysierten Esterhydrolyse wird allgemein als ein aus drei Schritten bestehender Vorgang beschrieben:



S = Substrat

E = Enzym

ES' = Michaelis-Menten-Komplex

ES = Acyl-Enzym

P₁ = Alkohol

P₂ = Säure

Dieser Mechanismus schließt als wesentlichen Bestandteil die intermediäre Bildung eines Acyl-Enzyms ein. Als nucleophiles Agens wirkt die OH-Gruppe eines Serinmoleküls.

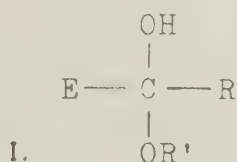
So wurde bei der Hydrolyse von durch radioaktives (³²P) Diisopropylfluorophosphat inaktiviertem Trypsin^{16,17} der Phosphor an dem katalytisch wirksamen Serin gefunden.

S.A. Bernhard, S.J. Lau und H. Noller¹⁸ berichten die Übereinstimmung der UV-Spektren von Cinnamoyl-, Furylacryloyl- und Indolylacryloyl-Chymotrypsin mit den entsprechenden N-Acetylserinamidderivaten. (Die nahezu vollständige Übereinstimmung der katalytisch wirksamen Sequenz von Trypsin und Chymotrypsin¹⁹, sowie Untersuchungen über die Hydrolyse von Substraten, die für beide Enzyme unspezifisch sind²⁰, führen zu dem Ergebnis, daß Trypsin und Chymotrypsin nach dem gleichen Mechanismus agieren und sich nur in ihrer Spezifität unterscheiden.)

Bei der Reaktion von Chymotrypsin mit Nitrophenylacetat²¹ wurde eine schnelle Bildung von Nitrophenol und ein langsames Freiwerden von Essigsäure beobachtet, was in dem vorausgestellten Mechanismus der schnellen Bildung des Acyl-Enzyms und dessen langsamerer Hydrolyse zu Enzym und Säure entspricht. Den gleichen Befund berichten H. Gutfreund und J.M. Sturtevant²² bei der Untersuchung von Pseudo-Substraten, die ihre Absorption bei der Acylierung und Deacylierung änderten. Im Einklang mit dem am Anfang vorgestellten Mechanismus befindet sich auch die Tatsache, daß die Geschwindigkeitskonstanten, k_o , der tryptischen²³ bzw. chymotryptischen^{24,25} Hydrolyse für verschiedene Ester der gleichen Säure übereinstimmende Werte gefunden werden. Dies bedingt, daß für die verschiedenen Ester ein gemeinsames Zwischenprodukt, das Acyl-Enzym, besteht, und daß die Spaltung dieses Zwischenproduktes der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Katalyse darstellt.

Bei Untersuchung der tryptischen Hydrolyse spezifischer Substrate im Vorgleichgewichts-Zustand mit Hilfe von "rapid-flow" - Methoden fanden S.A. Bernhard und H. Gutfreund²⁶ sowie T.E. Barman und H. Gutfreund²⁷, daß zwischen Michaelis-Menten-Komplex und Acyl-Enzym zumindest noch eine Zwischenstufe besteht. Für diesen Reaktionsschritt bietet S.A. Bernhard²⁸ folgende zwei Deutungen: 1. Es handelt sich hierbei um eine Änderung in der Struktur des Enzyms, was eine dynamische Mitwirkung des Enzyms im Laufe der Katalyse bedeuten würde. 2. Es handelt sich um ein chemisch gebildetes Zwischenprodukt bei dem noch keine Substratbindung gelöst ist. (Der Übergang von dem Michaelis-Menten-Komplex zu diesem Zwischenprodukt muß auf Grund der experimentellen

Daten reversibel sein, eine Abspaltung des Alkohols aber wäre irreversibel.) Ein solches Zwischenprodukt wäre eine Enzym-Substratverbindung mit einem tetragonalen Acyl-Kohlenstoff (I).



H.P. Kassera und K.J. Laidler²⁹ führten mit Hilfe der "stopped-flow" - Technik kinetische Messungen an dem System N-Carbobenzoxo-L-alanin-p-nitrophenylester/Trypsin durch und analysierten die erhaltenen Daten nach der Guggenheim-Methode. Die Ergebnisse dieser Analyse stützen den vorgestellten Dreistufenmechanismus.

Bei Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit der durch Trypsin bzw. Chymotrypsin katalysierten Hydrolyse^{30,31} wurde festgestellt, daß mehrere ionisierbare Gruppen an dem Hydrolysemechanismus beteiligt sind.

Die eine Gruppe mit einem $pK \sim 7$, die sowohl an der Acylierung als auch an der Deacylierung beteiligt ist, wurde als die Imidazolgruppe eines Histidinmoleküls identifiziert^{30,31}.

Von einer zweiten Gruppe mit einem $pK \sim 9$, die sich nur bei der Acylierung bemerkbar macht, nimmt man an³², daß sie der Ammoniumgruppe des endständigen Isoleucins entspricht.

M.L. Bender und F.J. Kézdy³³ nehmen an, daß die Ammoniumgruppe, zusammen mit einer Carboxylgruppe, für die Aufrechterhaltung einer für die Acylierung des Enzyms notwendigen Konformation sorgt. Nach der Acylierung wird dies durch die Acyl-Enzymbindung

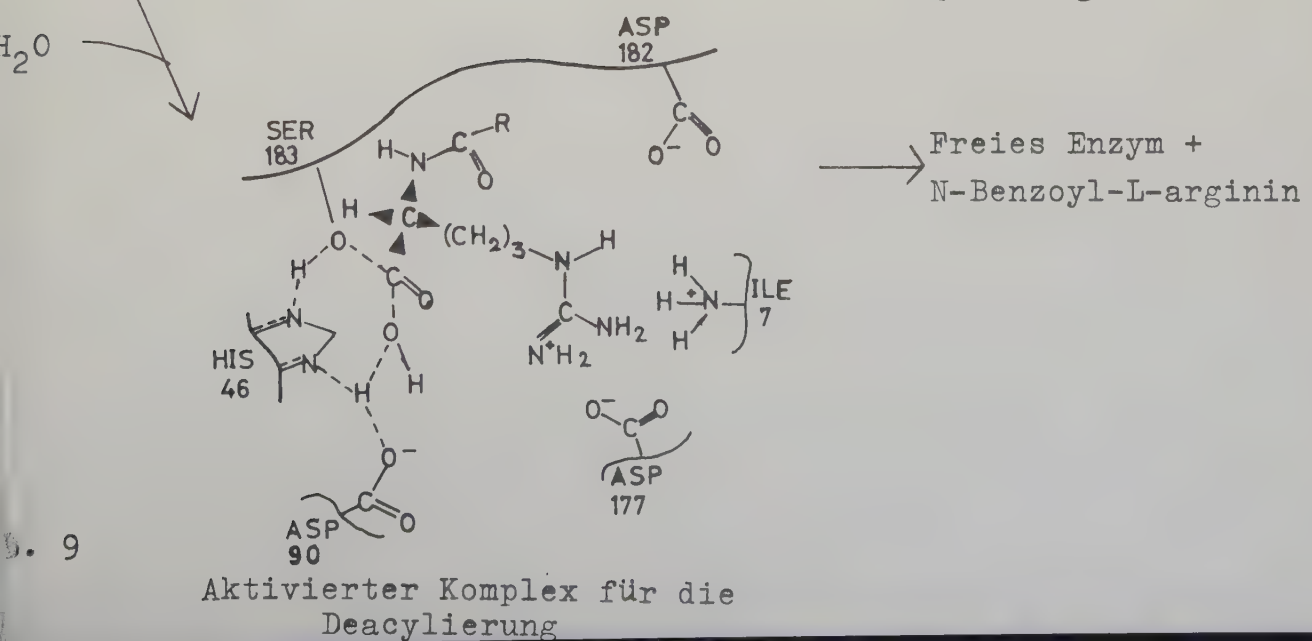
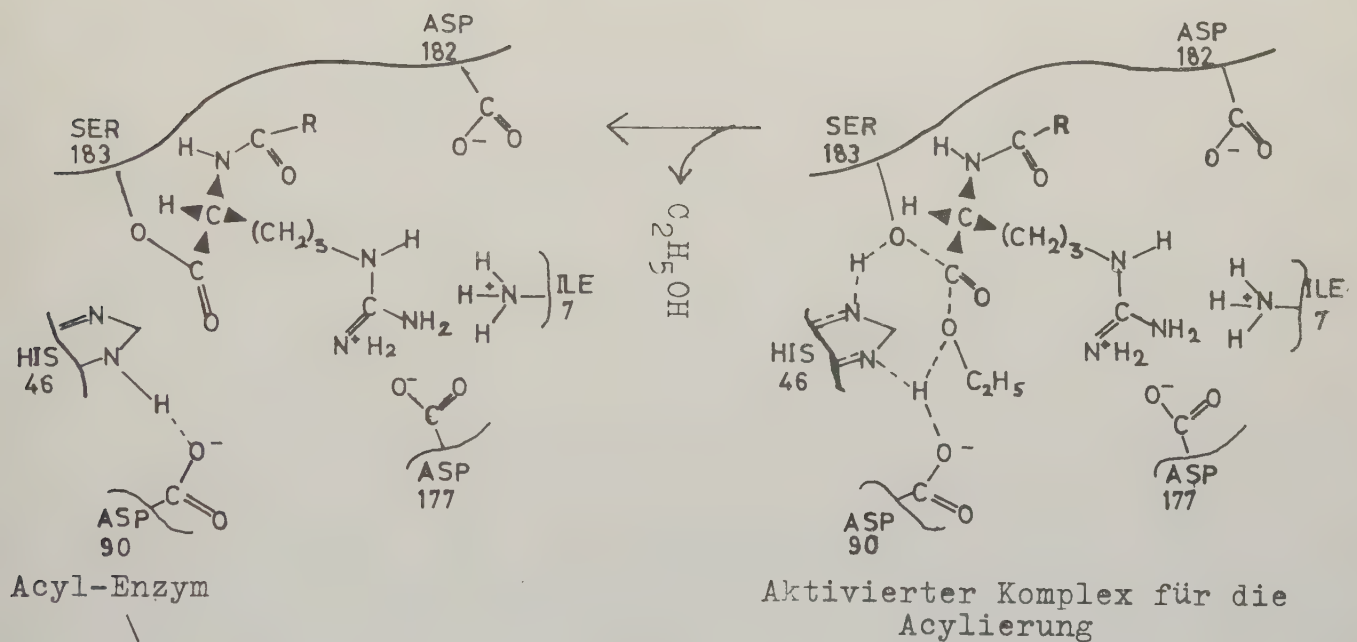
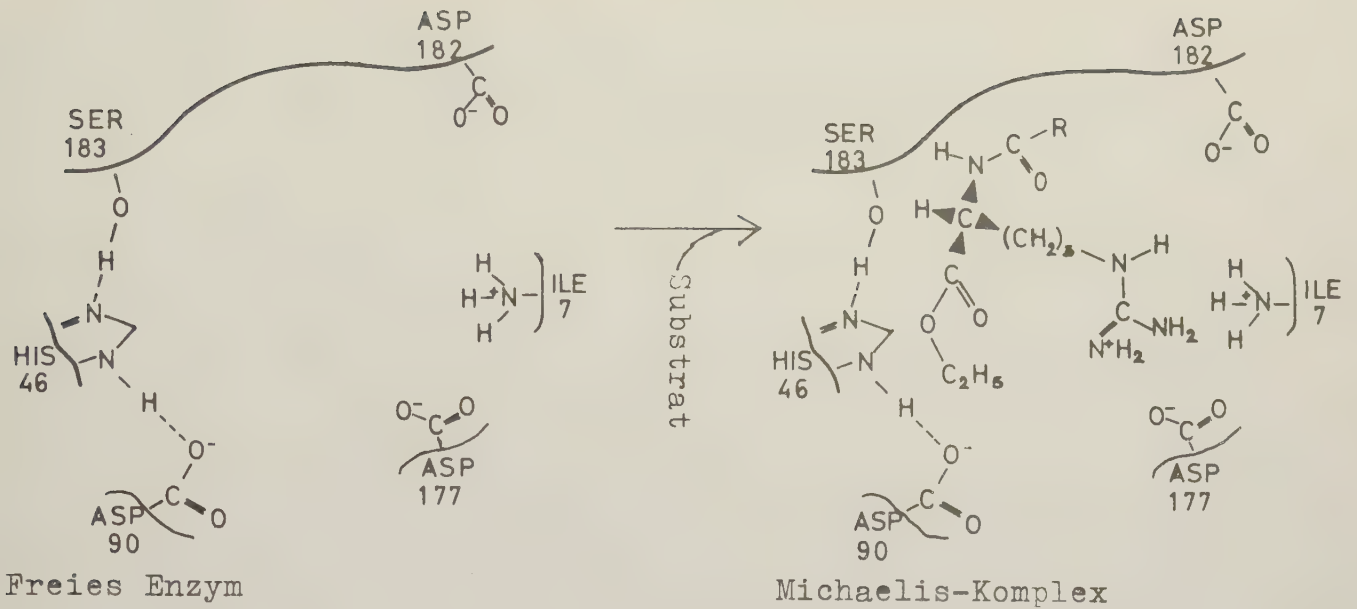
übernommen, so daß bei der Deacylierung diese Ammoniumgruppe keine Rolle mehr spielt.

Der von H.P. Kassera und K.J. Laidler³⁴ unter Kenntnis des Röntgenspektrums von Trypsin formulierte Mechanismus der tryptischen Esterhydrolyse (Abb. 9) scheint mir mit dem Stand der gegenwärtigen Kenntnisse konsistent. Hierbei ist noch zu bedenken, daß zwischen Michaelis-Menten-Komplex und Acyl-Enzym eventuell noch weitere Zwischenprodukte existieren, über deren Konstitution bislang allerdings noch keine ausreichenden Aussagen vorliegen.

Ein Vergleich der in dieser Arbeit über die tryptische Hydrolyse von TCET gewonnenen Ergebnisse mit diesem Mechanismus zeigt, daß die tryptische Hydrolyse von TCET diesem Mechanismus in seinem Kernstück, nämlich der intermediären Bildung eines Acyl-Enzyms, widerspricht.

Wenn während der tryptischen Hydrolyse von TCET ein Acyl-Enzym entstehen würde, so müßte als Endprodukt eine Thionosäure und nicht wie von uns gefunden eine Dithiosäure entstehen. Die einfachste Erklärung dieses Tatbestandes wäre, daß die enzymatische Spaltung von TCET nicht in dem für Sauerstoffester katalytisch wirksamen Bereich von Trypsin stattfindet. Die Tatsache, daß TCET die tryptische Hydrolyse eines spezifischen Substrats (BLEET) kompetitiv inhibiert, und die Übereinstimmung der Konstanten der Inhibition, K_i , und der tryptischen Hydrolyse von TCET, K_m , schließen diese Erklärung aus.

Es muß also innerhalb der katalytisch wirksamen Sequenz von Trypsin zumindest neben dem über ein



Acyl-Enzym verlaufenden Mechanismus noch ein zweiter Spaltungsmechanismus möglich sein.

E. Zusammenfassung

Die spontane Hydrolyse von TCET liefert zwei Produkte: Thiocaprolactam und 6-Aminodithiocaprone. Andere von uns untersuchte Aminodithiosäureester (N-Benzoylglycinäthylester, N-Acetyldithiophenylalaninäthylester) ergaben bei der Hydrolyse die entsprechenden Aminodithiocarbonsäuren. Die Hydrolysegeschwindigkeit war deutlich abhängig von der Konzentration der OH-Ionen. Die Spaltung von Dithiocarbonsäureestern verläuft demnach nach dem seltenen $B_{A1}2$ -Mechanismus. Die entstehenden Dithiocarbonsäuren sind bei den Bedingungen der Hydrolyse nicht beständig.

Die tryptische Spaltung von TCET liefert 6-Aminodithiocaprone. Trypsin katalysiert also die Spaltung der S-Alkylbindung. Sollte während der tryptischen Hydrolyse von TCET ein den Sauerstoffestern analoges Thionoacyl-Enzym auftreten, so müßte das Endprodukt der tryptischen Hydrolyse die Thionsäure und nicht, wie von uns festgestellt, die Dithiosäure sein.

Für das Substrat TCET tritt demnach während der tryptischen Hydrolyse kein Thionoacyl-Enzym als Zwischenprodukt der Spaltung auf. Die Übereinstimmung der Inhibitionskonstante (K_i) und der Michaelis-Menten-Konstante (K_m) zeigt, daß die tryptische Hydrolyse von TCET an der gleichen aktiven Stelle des Enzyms erfolgt, die auch für die Spaltung spezifischer Substrate verantwortlich ist. Es muß demnach in Betracht gezogen werden, daß die enzymatische Katalyse nicht unbedingt an die zwischenzeitliche Bildung eines Acyl-Enzyms gebunden ist.

Literaturverzeichnis

- | | | | | |
|-----|---|--|----------|------|
| 1) | G. Lowe
A. Williams | Biochem.J. | 96, 194 | 1965 |
| 2) | C.N.R. Rao | "Ultra-Violet and Visible Spectroscopy"
Butterworths, London | | 1967 |
| 3) | H. Hartmann
W. Stapf
J. Heidberg | Liebigs Ann.Chem. | 729, 237 | 1969 |
| 4) | E. Holler | Diplomarbeit, Frankfurt/Main | | 1965 |
| 5) | E. Holler
H. Hartmann | Eur. J.Biochem. | 16, 80 | 1970 |
| 6) | M. Bergmann
J.S. Fruton
H. Pollok | J.Biol.Chem. | 127, 643 | 1939 |
| 7) | H. Hänsel | "Grundzüge der Fehlerrechnung"
VEB Deutscher Verlag der
Wissenschaften | | 1965 |
| 8) | Houben-Weyl | "Methoden der org.Chemie Band XI/2"
Georg Thieme Verlag, Stuttgart | | 1958 |
| 9) | A. Hantzsch
W. Brucerus | Berichte | 59, 793 | 1926 |
| 10) | E.S. Gould | "Mechanismus und Struktur in der
org.Chemie"
Verlag Chemie G.m.b.H., Weinheim/Bergstr. | | 1964 |
| 11) | G.S. Eadie | J.Biol.Chem. | 146, 85 | 1942 |

- 12) J.L. Webb "Enzyme and Metabolic Inhibitors"
Vol. I, Ac.Pr. New York, London 1963
- 13) Y. Sakurada
- 14) A.R. Olson J.Am.chem.Soc. 60, 2687 1938
R.J. Miller
- 15) P.D. Bartlett J.Am.chem.Soc. 73, 4237 1951
F.N. Rylander
- 16) B.S. Hartley Biochim.biophys.Acta 34, 243 1959
M.A. Naughton
F. Sanger
- 17) F. Sanger Proc.Chem.Soc. 76 1963
- 18) S.A. Bernhard Biochemistry 4, 1108 1965
S.J. Lau
H. Noller
- 19) M.L. Bender A. Rev. Biochem. 34, 49 1965
J.J. Kézdy
- 20) T. Inagami J. Biol. Chem. 239, 1388 1961
H. Mitsuda
- 21) B.S. Hartley Biochem.J. 56, 288 1954
B.A. Kilby
- 22) H. Gutfreund Proc.nat.Acad.Sci. 42, 719 1956
J.M.Sturtevant Wash.
- 23) H. Gutfreund Biochem.J. 73, 526 1959
B.R. Hammond

- | | | | | |
|-----|--|--|----------|------|
| 24) | B. Zerner
R.P.M. Bond
M.L. Bender | J.Am.chem.Soc. | 86, 3674 | 1964 |
| 25) | N.J. Baines
J.B. Baird
D.T. Elmore | Biochem.J. | 90, 470 | 1964 |
| 26) | S.A. Bernhard
H. Gutfreund | Proc.nat.Acad.Sci.
Wash. | 53, 1238 | 1965 |
| 27) | T.E. Barman
H. Gutfreund | Biochem.J. | 101, 411 | 1966 |
| 28) | S.A. Bernhard | "The Structure and Function of Enzymes"
W.A.Benjamin, Inc. New York | | 1968 |
| 29) | H.P. Kassera
K.J. Laidler | Can.J.Chem. | 48, 1793 | 1970 |
| 30) | H. Gutfreund | Trans.Faraday Soc. | 51, 411 | 1955 |
| 31) | M.L. Bender
G.E. Clement
F.J. Kézdy
H.D'A. Heck | J.Am.chem.Soc. | 86, 3680 | 1964 |
| 32) | P. Labouesse
H.L.Oppenheimer
G.P. Hess | Biochem.Biophys. | 14, 318 | 1964 |
| 33) | M.L. Bender
F.J. Kézdy | J.Am.Chem.Soc. | 86, 3704 | 1964 |
| 34) | H.P. Kassera
K.J. Laidler | Can. J. Chem. | 47, 4031 | 1969 |

Lebenslauf

Ich wurde am 9. April 1939 in Hofheim/Taunus als Sohn des Malers und Lackierers Julius Stapf und seiner Ehefrau Anna, geb. Pfeiffer, geboren.

Von Ostern 1946 bis Ostern 1950 besuchte ich in Hofheim/Taunus die Volksschule, anschließend bis 1956 die Mittelschule, die ich mit dem Abschlußzeugnis (Mittlere Reife) verließ.

Ab Ostern 1956 war ich als Chemielaboranten-Lehrling bei den Farbwerken Hoechst A.G. beschäftigt. Die Lehre schloß ich im Herbst 1959 mit der Gehilfenprüfung ab.

Von April 1958 bis Herbst 1960 nahm ich an Vorbereitungskursen für die Reifeprüfung bei Herrn Assessor Paul Adam in Frankfurt/Main teil und bestand die Reifeprüfung am 12. Oktober 1960 in Wiesbaden.

Seit dem Sommersemester 1961 studiere ich an der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt/Main Chemie. Die Diplomchemiker-Vorprüfung legte ich am 12. Dezember 1963 ab. Im Januar 1966 legte ich die mündliche Prüfung für das Hauptexamen ab und fertigte anschließend im Institut für physikalische Chemie unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Hartmann die Diplomarbeit an, die ich am 9. Oktober 1967 bei dem Prüfungsausschuß für Diplomchemiker einreichte. Anschließend widmete ich mich der Dissertation unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Hartmann.

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. Hartmann, Prof. Dr. Wieland, Prof. Dr. Royen, Prof. Dr. Fischer, Prof. Dr. König, Prof. Dr. Freise, Prof. Dr. Schläfer, Prof. Dr. Müser, Prof. Dr. Martienssen, Prof. Dr. Moufang, Dr. Sauer, Prof. Dr. Ried, Prof. Dr. O'Daniel, Priv.Do. Dr. Determann.

